

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МЕДИЦИНА

© Колісник І.Л

УДК: [616-099-02:543.272.455]-092.9-07:616.15- 078: [577.175.823:577.112.387].088.6

DOI <https://doi.org/10.31718/mep.2020.24.5-6.06>

## ІНТЕНСИВНІСТЬ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ У КРОВІ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ФТОРИДУ НАТРІЮ

Колісник І.Л

Харківська медична академія післядипломної освіти, м. Харків

Вплив фторид-іона як хімічного агента впливає на метаболізм, зміна якого проявляється в функціональних і структурних змінах. До кінцевих стабільних метаболітів NO відносяться нітрит і нітрат-аніони ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ), визначення концентрації яких є непрямим методом оцінки інтенсивності синтезу NO. Концентрація NO є головним фактором його чисельних біоефектів (регуляторного, захисного, пошкоджуючого). При низьких концентраціях NO переважають прямі ефекти, спрямовані на підтримку гомеостазу, наприклад, судинної, дихальної та нервової систем; при високих концентраціях NO – переважають непрямі ефекти, зумовлені, перш за все, утворенням пероксинітриту. Відомо, що при підвищенні в організмі швидкості вільнорадикальних реакцій NO може вступати у реакцію з супероксидним аніон-радикалом з утворенням пероксинітриту – високо реакційної сполуки з деструктивними властивостями по відношенню до білків і ліпідів. Пероральне введення щурам фториду натрію (ФН) у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 призводить, протягом перших 30 діб, до підвищення у плазмі крові вмісту нітрит- і нітрат-аніонів, що опосередковано свідчить про надлишкову продукцію оксиду азоту, який у початкові терміни інтоксикації може виконувати компенсаторну роль, але у подальшому викликати патологічні реакції, пов'язані з активацією оксидативного стресу. Зниження нітрит- і нітрат-аніонів наприкінці тривалої дії ФН опосередковано свідчить про зменшення генерації оксиду азоту, що може бути пов'язано, зокрема, з підвищенням концентрації пероксинітриту в результаті використання оксиду азоту у реакції з супероксидним аніон-радикалом і дефіцитом антиоксидантних ферментів.

**Ключові слова:** фторид натрію, оксид азоту, інтоксикація, нітрит-аніони, нітрат-аніони

### Вступ

Сполуки фтору широко поширені в природі і є виробничим забруднювачем [1]. У вільному стані фтор в природі не існує, однак утворює неорганічні і органічні комплексні сполуки - фториди, зміст яких в Земній корі становить приблизно 0,06-0,09%. Відомо, що низькі концентрації фтору необхідні для нормального росту і розвитку організму. Однак при надмірному надходженні в організм відбуваються значні порушення функцій життєво важливих органів, пошкодження клітин, некроз. Вплив фторид-іона як хімічного агента впливає на метаболізм, зміна якого проявляється в функціональних і структурних змінах. На рівні ушкоджують фактори включають кілька патогенетичних механізмів, а саме: порушення енергетичного забезпечення процесів, що протікають в клітині і пошкодження мембранних структур і ферментних систем клітини [2]. Фторид натрію (ФН) є метаболічною отрутою, і в першу чергу має мембранопошкоджуючий ефект. При хронічній хімічній навантаженості виникають системні зміни функціонального стану організму на всіх рівнях інтеграції, або синдром екологічно обу-

мовленого зниження резистентності організму. Результатом розвитку цього синдрому є ефект хімічної модифікації, тобто збільшення числа і погіршення перебігу захворювань тих чи інших органів на тлі зниження імунних показників і порушення захисно-адаптаційних можливостей [3]. При збільшенні кількості фториду натрію в організмі виникають захворювання ЦНС, ендокринної системи, органів травлення, зокрема печінки. В експерименті встановлено, що при тривалому впливові фториду натрію в печінці діагностується білкова і жирова дистрофія, поява в крові продуктів перекисного окислення ліпідів. Ступінь патогенного впливу при розвитку стрес-реакції багато в чому визначається станом стрес-лімітуючих систем, зокрема, системи оксиду азоту (NO). Доведено, що NO-залежна регуляція центральних ланок стрес-реакції забезпечується тим, що гіпофіз отримує від гіпоталамуса широко представлену NO-ергічну іннервацію [4]. Виявлена властивість NO модулювати вивільнення основних стрес-гормонів гіпофізу дозволяє припустити важливу роль NO в регуляції його функціонування та попередженні надмірної

\* Цитування при атестації кадрів: Колісник І.Л. Інтенсивності синтезу оксиду азоту у крові щурів під впливом фториду натрію. // Проблеми екології і медицини. – 2020. – Т. 24, № 5-6. – С. 21–24.

активації центральної ланки стрес-системи. У літературі є дані щодо можливості NO блокувати периферичний викид стрес-гормонів та захищати клітини й органи від стресорних пошкоджень [5]. Зокрема, у незначних концентраціях NO пригнічує вивільнення катехоламінів з надниркових залоз і симпатичних нервових закінчень, призводячи до обмеження стрес-реакції.

До кінцевих стабільних метаболітів NO відносяться нітрит і нітрат-аніони ( $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ), визначення концентрації яких служить непрямим методом оцінки інтенсивності синтезу NO [6]. Концентрація NO є головним фактором його чисельних біоефектів (регуляторного, захисного, пошкоджуючого). При низьких концентраціях NO переважають прямі ефекти, спрямовані на підтримку гомеостазу, наприклад, судинної, дихальної та нервової систем; при високих концентраціях NO – переважають непрямі ефекти, зумовлені, перш за все, утворенням пероксинітриту. Відомо, що при підвищенні в організмі швидкості вільнорадикальних реакцій NO може вступати у реакцію з супероксидним аніон-радикалом з утворенням пероксинітриту – високо реакційної сполуки з деструктивними властивостями по відношенню до білків і ліпідів [7].

Метою роботи було використання інтенсивності синтезу NO за умов тривалої фторидної інтоксикації.

#### Матеріал та методи дослідження

Дослідження проводилися на статевозрілих щурах лінії Wistar вагою 180-220 г, яких утримували у стаціонарних умовах віварію за постійної температури та природного освітлення у пластикових клітках на збалансованому харчовому раціоні. Щурів піддавали пероральній затравці за допомогою зонда водними розчинами фториду натрію щоденно одноразово протягом 60 днів у дозах 1/10, 1/100 і 1/1000 ДЛ<sub>50</sub>, що відповідно становило 20 мг/кг, 2 мг/кг та 0,2 мг/кг маси тіла (середньолетальна доза фториду натрію для щурів, отримана перорально, становить 200 мг/кг). Всі маніпуляції проводили в стандартних умовах з 9<sup>00</sup> до 10<sup>00</sup>, тварин виводили з експериментів через 24 години після останнього введення фториду натрію. Тваринам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. Дослідження показників проводили через 10, 20, 30, 50 і 60 днів після початку експерименту. У кожній групі було по 10 тварин. Забій проводили шляхом декапітації гільйотинним ножом, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію у дозі 50 мг/кг маси. Печінку перфузували охолодженим розчином до повного видалення слідів крові, видаляли, вирізали ділянки сполучної тканини, просушували на фільтрувальному папері, заморожували й зберігали в рідкому азоті. Для отримання гомогенату печінки наважку тканини подрібнювали на холоді та гомогенізували у скляному гомогенізаторі Поттера з тефлоновим товчачиком в охолодженому середовищі виділення (0,25 М розчин сахарози, який готували на 0,01 М трис-НСІ буфері, рН-7,4 з додаванням 1 мМ ЕДТА). При роботі з тваринами керувались вимогами «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, що використовуються в експерименті та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986 р.), Закону України №3447-IV від 21.02.2006 р «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Про інтенсивність синтезу NO в організмі щурів за умов тривалої фторидної інтоксикації судили за

вмістом у плазмі крові його кінцевих стабільних метаболітів – нітрит- і нітрат-аніонів (відображають сумарну відповідь всіх ізоформ NO-синтази). Вміст нітрит- і нітрат-аніонів у плазмі крові визначали спектрофотометрично при 540 нм за допомогою кольорової реакції з реактивом Грисса. Перед початком аналізу проводили осадження білків 0,5 н КОН та 5%  $\text{ZnSO}_4$ . Оскільки реакція діазотування є специфічною тільки на нітрити, то для визначення нітратів проводили їх попереднє відновлення. Для обробки даних використовували статистичні методи.

#### Результати та їх обговорення

У щурів, токсифікованих ФН у дозі 1/10 ДЛ<sub>50</sub>, спостерігалось вірогідне ( $p < 0,001$ ) по відношенню до контрольної групи тварин підвищення рівня плазмових нітрит-аніонів у середньому на 43, 81 та 34 % відповідно на 10, 20 та 30-ту добу (рис. 1). На 50 та 60-ту добу спостереження вміст нітрит-аніонів у плазмі крові експериментальних тварин, навпаки, знижувався ( $p \leq 0,002$ ) на 31 та 26 % (рис. 2).

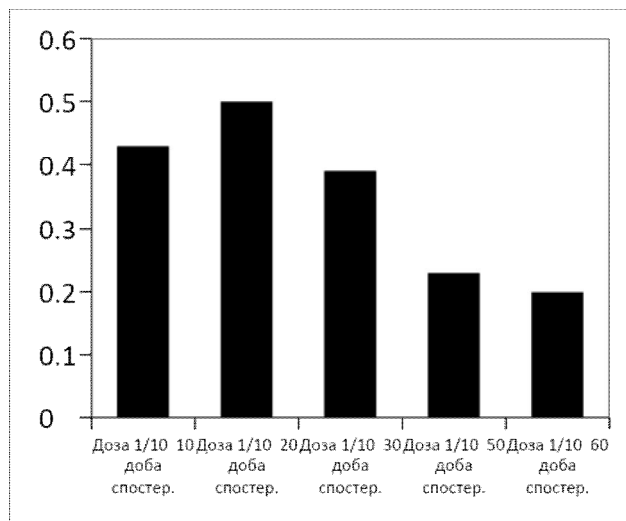


Рис. 1. Вміст нітрит-аніонів у плазмі крові щурів при дії фториду натрію у субтоксичних дозах ( $n=10$ ; Ме [25%; 75%] або  $M \pm s$ )

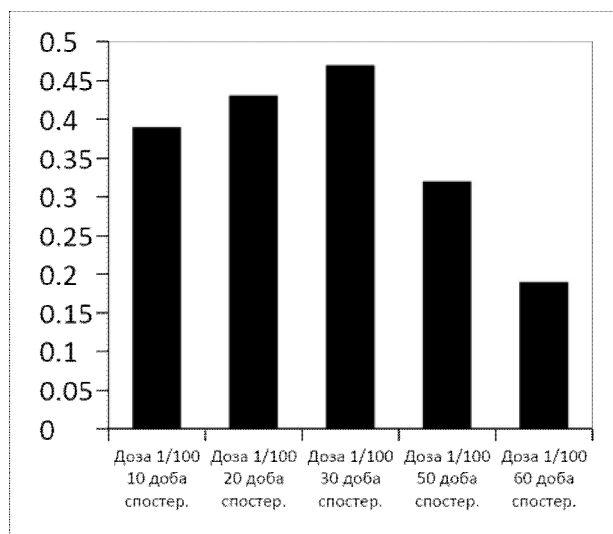


Рис. 2 Вміст нітрит- і нітрат-аніонів у плазмі крові щурів при дії фториду натрію у субтоксичних дозах ( $n=10$ ; Ме [25%; 75%] або  $M \pm s$ )

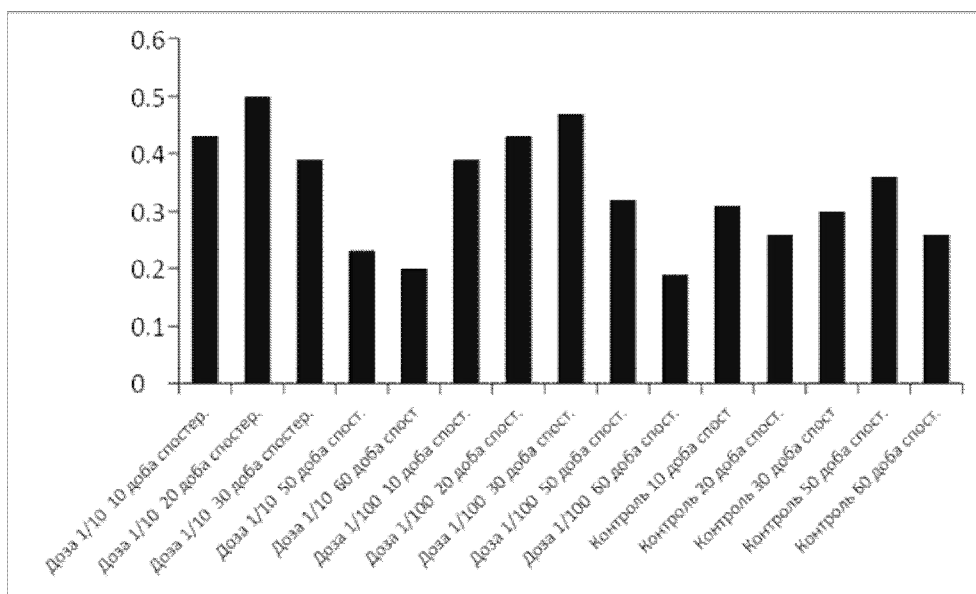


Рис. 3. Динаміка змін вмісту нітрит-аніонів (у % по відношенню до контролю) у плазмі крові щурів при токсифікації фторидом натрію у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50

Примітка: вміст у контрольній групі тварин прийнятий за 100 %

Введення тваринам ФН у дозі 1/100 ДЛ50 призвело також до статистично значимого ( $p < 0,001$ ) збільшення вмісту плазматичних нітрит-аніонів на 10, 20 та 30-добу експерименту відповідно на 32, 59 і 61 %. На 50-ту добу рівень нітрит-аніонів наблизився до рівня тварин контрольної групи ( $p = 0,162$ ), а на 60-ту добу – знизився ( $p = 0,001$ ) в середньому на 30 %.

Результати свідчили про статистично значиме ( $p < 0,001$ ) по відношенню до контрольної групи тварин підвищення концентрації нітрат-аніонів у плазмі крові щурів, яким вводили ФН у дозі 1/100 ДЛ50, на 10, 20, 30 та 50 добу відповідно на 45, 79, 71 та 34 %. На 60-

ту добу спостереження рівень нітрат-аніонів практично не відрізнявся від контролю ( $p = 0,186$ ).

Дія ФН у дозі 1/100 ДЛ50 супроводжувалась поступовим підвищенням порівняно з контролем вмісту нітрат-аніонів у плазмі крові дослідної групи щурів: на 10-ту добу в середньому на 22 % ( $p = 0,003$ ), на 20-ту добу – на 39 % ( $p = 0,001$ ), на 30-ту добу – на 41 % ( $p < 0,001$ ). На 50-ту добу спостереження відмічалось також збільшення рівня нітрат-аніонів на 13 %, але воно виявилось невіргодним ( $p = 0,089$ ), тоді як на 60-ту добу, навпаки, спостерігалось вірогідне ( $p = 0,011$ ) зниження на 17 % (рис. 3).

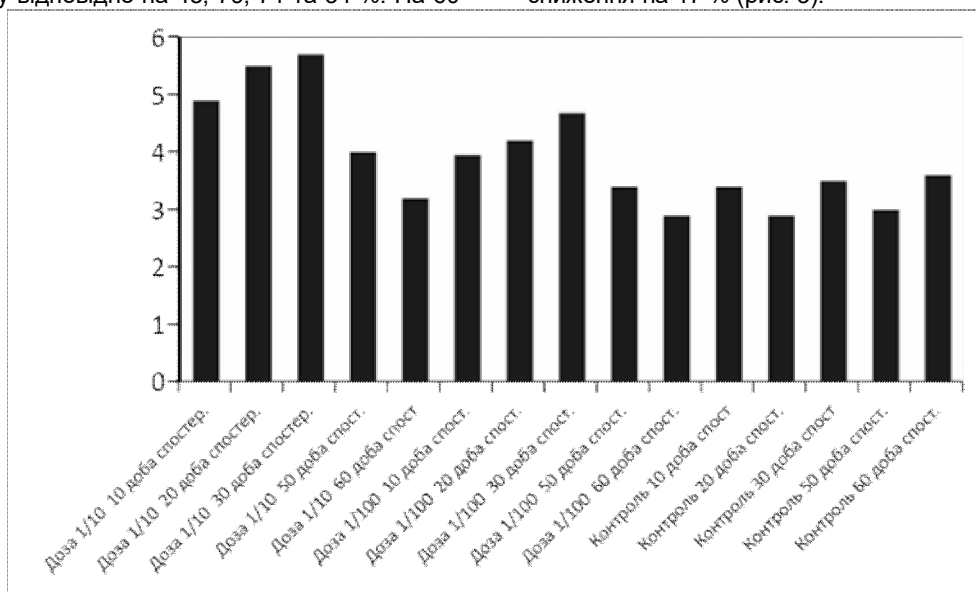


Рис. 3. Динаміка змін вмісту нітрат-аніонів (у % по відношенню до контролю) у плазмі крові щурів при токсифікації фторидом натрію у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50

Примітка: вміст у контрольній групі тварин прийнятий за 100 %

Отже, виявлене підвищення у плазмі крові щурів вмісту нітрит- та нітрат-аніонів при дії ФН у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 опосередковано свідчить про надлишкову продукцію NO, що у початкові терміни інтоксикації може виконувати компенсаторну роль, але у подаль-

шому трансформуватись у патологічну реакцію з активацією оксидативного стресу. Як правило, надлишковий рівень кінцевих стабільних метаболітів NO пов'язують з гіперекспресією індукційної ізоформи NO-синтази (iNOS), що виникає в результаті оксида-

тивного стресу. iNOS продукує NO у кількості, що на кілька порядків перевищує продукцію NO ендотеліальною ізоформою NO-синтази та зумовлює стимулювання утворення вільних радикалів [7]. У результаті утворюється більша за норми кількість NO, що підтверджується збільшенням вмісту його кінцевих продуктів.

Виявлене зниження нітрит- і нітрат-аніонів наприкінці тривалої дії ФН опосередковано свідчить про зниження генерації NO, що може бути пов'язано з рядом причин, наприклад, з пригніченням активності NO-синтази, підвищенням концентрації пероксинітриту в результаті використання NO у реакції з супероксидним аніон-радикалом, дефіцитом ферментів антиоксидантної системи, зменшенням попередника синтезу NO – аргініну або основного кофактора NO-синтази – тетрагідроптерину та ін. [8].

### Висновки

Пероральне введення шурам ФН у дозах 1/10 і 1/100 ДЛ50 призводить протягом перших 30 діб до підвищення у плазмі крові вмісту нітрит- і нітрат-аніонів, що опосередковано свідчить про надлишкову продукцію оксиду азоту, який у початкові терміни інтоксикації може виконувати компенсаторну роль, але у подальшому викликати патологічні реакції, пов'язані з активацією оксидативного стресу. Зниження нітрит- і нітрат-аніонів наприкінці тривалої дії ФН опосередковано свідчить про зменшення генерації оксиду азоту, що може бути пов'язано, зокрема, з підвищенням концентрації пероксинітриту в результаті використання оксиду азоту у реакції з супероксидним аніон-радикалом і дефіцитом антиоксидантних ферментів.

### Література

1. Alekhina DA, Zhukova AG, Sazontova TG. Low dose of fluoride influences to free radical oxidation and intracellular

- protective systems in heart, lung and liver. Technologies of living systems. 2016; 13(6): 4956.
2. Kazarina LN, Samarkina AN, Pursanova AE. Medical aspects of complex prophylaxis and treatment of fluorosis in the case of children living in endemic district. Medical Almanac. 2015; (3): 172175.
3. Zhukova AG, Mikhailova NN, Yadykina TK, Alekhina DA, Gorokhova LG, Romanenko DV et al. Experimental studies of intracellular liver protective mechanisms in development of chronic fluorine intoxication. Occupational medicine and industrial ecology. 2016; (5): 2124
4. Akimov OY, Mishchenko AV, Kostenko VO. Influence of combined nitrate and fluoride intoxication on connective tissue disorders in rats gastric mucosa. Archives of the Balkan Medical Union. 2019; 54(3):11-15. doi: 10.31688/ABMU.2019.54.3.03
5. Yelins'ka AM, Akimov OY, Kostenko VO. Role of AP-1 transcriptional factor in development of oxidative and nitrosative stress in periodontal tissues during systemic inflammatory response. Ukrainian Biochemical Journal. 2019; 91(1):80-85. doi: https://doi.org/10.15407/ubj91.01.080
6. Akimov OYe, Kovalova IO, Kostenko VO. Correction of destructive changes in connective tissues of different organs during chronic nitrate and fluoride intoxication by nanosized silica oxide. Journal of Education, Health and Sport. 2019; 9(5):547-555. doi: http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.3238594.
7. Akimov OYe, Mishchenko AV, Kostenko VO. Correction of oxidative stress in gastric mucosa of rats by enterosorbents of different classes during chronic nitrate fluoride intoxication. Aktual'ni problemy suchasnoyi medytyny: Visnyk Ukrayins'koyi medychnoyi stomatolohichnoyi akademiyi. 2019; 19(2):103-106. doi: 10.31718/2077-1096.19.2.103.
8. Akimov OYe, Kostenko VO. Superoxide and peroxyntirite production in gastric mucosa of rats under combined nitrate-fluoride intoxication. Journal of the Grodno State Medical University. 2018; 16(6):730-734. doi: 10.25298/2221-8785-2018-16-6-730-734

Матеріал надійшов до редакції 02.11.2020